

Slutrapport för projekt H1047248

Anslagsmottagare Prof. Bengt Guss, institutionen för mikrobiologi, SLU

Projekttitel: Studier av extracellulära proteiner hos *Streptococcus equi* och *Streptococcus zooepidemicus* för ökad kunskap om olika streptokockinfektioner hos häst.

Bakgrund

Både *Streptococcus equi* underart *equi* (*S. equi*) och underart *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) är bakterier vilka orsakar olika sjukdomar hos häst. *S. equi* orsakar den välkända och rapportpliktiga sjukdomen **kvarka** vilken är mycket smittsam och orsakar förutom lidande hos hästen även stora ekonomiska problem för hästnäringen. I motsats till *S. equi* betraktas *S. zooepidemicus* som en opportunist vilken förekommer i rad olika sjukdomar hos häst och betraktas som den mest frekvent isolerade opportunistiskt patogena bakterien hos häst. Denna underart orsakar infektioner i bl.a. sår, leder och luftvägar samt förekommer i reproduktionsstörningar. *Streptococcus zooepidemicus* är inte värdspecifik, utan orsakar även frekvent sjukdom hos andra djurslag t.ex. nötkreatur men den kan även drabba människa. Trots att underarterna ger upphov till olika sjukdomar har bioinformatiska analyser av genomen visat att de är genetiskt mycket nära besläktade.

Vår forskargrupp har under många år studerat potentiella virulensfaktorer hos dessa bakterier och det rapporterade forskningsprojektet var en fortsättning på dessa projekt. Vår arbetshypotes har varit, och är det fortfarande, att bakterier såsom *S. equi* och *S. zooepidemicus* har den genetiska kapaciteten att uttrycka ett stort antal olika virulensfaktorer som påverkar bakteriernas förmåga att kolonisera och undvika värdens immunförsvar. Dessa faktorer kan antingen vara förankrade i cellväggen eller transporteras ut ur cellen till den omgivande miljön. Identifiering och studier av funktionen hos dessa virulensfaktorer är en mycket viktig del i förståelsen av infektionsprocessen. En viss grupp av virulensfaktorer, **adhesiner** har visat sig specifikt mediera adhesion av bakteriecellen till strukturer hos värden vilket tros möjliggöra bakteriens kolonisation av värdjuret. Vidare kan vissa faktorer specifikt inhibera fagocytos eller störa värdens komplementaktiveringssystem samt påverka blodkoagulerings-mekanismen. Ett antal **toxiner** och **enzym** som påverkar värdens immunsvaret eller bryter ned specifika celler och komponenter i värdjurets bindväv har även identifierats.

För att utveckla metoder som effektivt kan förhindra en infektion, såsom t.ex. kvarka, är det vår uppfattning att man måste identifiera och studera de ingående komponenterna i interaktionen mellan patogen och värd för att förstå infektionsprocessen. Sammantaget var syftet med projektet att studera olika potentiella virulensfaktorer hos de hästpatogena streptokockerna *S. equi* och *S. zooepidemicus*.

Material och metoder

Bioinformatikstudier

Forskargruppen har en lång erfarenhet av att identifiera och analysera gener vilka kodar för extracellulära proteiner hos patogena streptokocker. Förutsättningar för att identifiera potentiella virulensfaktorer har under åren underlättats betydligt genom att genomen hos *S. equi* och *S. zooepidemicus* är sekvenserade och tillgängliga via Sanger Institute (<http://www.sanger.ac.uk>) vilket underlättat bioinformatikstudier. Komparativa analyser av andra genom från olika patogena streptokockarter ger också goda möjligheter att identifiera gener kodande för potentiella virulensfaktorer hos de hästpatogena streptokockerna.

Isolering och uttryck av rekombinanta proteiner

Framförallt är möjligheten att söka efter homologer till redan kända virulensfaktorer i besläktade patogena bakterier en viktig väg för att identifiera potentiella virulensfaktorer. För att studera funktioner hos virulensrelaterade proteiner är det viktigt att bioinformatiska studier bekräftas och kompletteras experimentellt. För att isolera de identifierade generna användes PCR och för att uttrycka generna användes ett för *E. coli* utvecklat expressionssystem kallat GST Gene Fusion System från GE Healthcare. Systemet är ett kombinerat expression- och proteinreningsystem vilket möjliggör att klonade gener (eller delar av) effektivt kan uttryckas och rekombinanta proteiner renas för vidare studier.

Studier av rekombinanta proteiner

De renade rekombinanta streptokockproteinerna analyserades med avseende på förmåga att binda till olika värdkomponenter t.ex. kollagen och fibronectin med hjälp av olika metoder såsom Western blot, ELISA samt med biosensorteknik genom att använda Biacore (GE Healthcare). Vidare studerades den enzymatiska aktiviteten hos två olika typer av faktorer genom att analysera deras aktivitet att klyva söder IgG respektive klyva bort kolhydratkedjor på IgG. Sammantaget användes flera olika konventionella metoder vilka framgår i våra publikationer.

Eukaryota cellförsök

Under projektiden fortsatte vårt samarbete med Prof. Kristofer Rubin, Uppsala Universitet för att undersöka ett antal av de rekombinanta proteinerna i ett eukaryot cellsystem för att analysera om proteinerna påverkar eukaryota celler, främst deras förmåga att interagera med extracellulära matrix-proteiner hos värden.

Vidare fortsatte vårt samarbete med Prof. Gunnar Pejlers forskargrupp vid SLU, ett samarbete som syftade till att studera hur *S. equi* påverkar mastceller.

Immuniserings- och vaccinationsförsök på möss

I samarbete med Prof. Flock's forskargrupp vid Karolinska institutet, undersöktes om det IgG modifierande enzymet EndoSe från *S. equi* gav upphov till antikroppar vid immunisering av möss samt om dessa blev skyddande vid en senare luftvägsinfektion av *S. equi*. Den experimentella infektion och challengemodellen kan i korthet beskrivas enligt följande. Efter tre intranasala immuniseringar av rekombinant EndoSe (eller fragment av EndoSe) infekterades försöksdjuren intranasalt med 10^6 CFU *S. equi*. Efter infektion mättes två parametrar, nasal kolonisation av bakterier samt kroppsviktsminskning. Av erfarenhet vet vi att dessa parametrar på ett bra sätt speglar summan av de eventuella skyddseffekter försöksdjuren får vid immunisering. Vidare är parametrarna lätta att kvantifiera och dessutom skonsamma för försöksdjuren. Alla djurförsök utfördes efter godkänd etisk prövning.

Konstruktion av mutanter

En forskargrupp vid Animal Health Trust (AHT), New Market, England, ledd av Dr. Andrew Waller, bedriver liksom vi ett molekylärbiologiskt arbete rörande *S. equi*. I Dr. Waller grupp har man satt upp en teknik för att konstruera specifika mutanter i *S. equi* och en specifik deletionsmutant saknande genen kodande för FNE har tidigare erhållits.

Resultat

Med utgångspunkt från tidigare studier har forskargruppen erfarenhet att via bioinformatikstudier identifiera Gram-positiva extracellulära cellväggsförankrade eller lösliga proteiner. Undersökning av genomdatabasen (Sanger) resulterade i att ett antal gener vilka

teoretiskt kodar för extracellulära proteiner hos *S. equi* och *S. zooepidemicus* identifierades. Bland dessa valde vi att fokusera oss på två olika grupper av enzymer för vidare analys. Den första gruppen var endopeptidaser vilka specifikt klyver sönder IgG och den andra var endoglykosidaser vilka specifikt klyver bort kolhydratkedjor hos IgG.

Specifika IgG-nedbrytande enzymer hos S. equi och S. zooepidemicus

Immunoglobuliner är av central betydelse i det immunologiska försvaret hos värden och vi har tidigare rapporterat om ett extracellulärt endopeptidas kallat IdeE från *S. equi* vilket specifikt klyver vissa subklasser av IgG hos häst. Ett nästan identiskt endopeptidas, kallat IdeZ, har också identifierats hos *S. zooepidemicus*. Vidare bioinformatikstudier visade att både *S. equi* och *S. zooepidemicus* har ett ytterligare IdeE/IdeZ liknande enzym kallade IdeE2 resp. IdeZ2. Generna kodande för IdeE2 resp. IdeZ2 har klonats och de rekombinanta proteinerna har uttryckts i *E. coli*. Efter rening har den antikroppsklyvande förmågan studerats med hjälp av en panel av renade antikroppar från olika djurslag inklusive människa. I samarbete med Dr. Waller vid AHT har fortsatta bioinformatikstudier visat att det finns olika varianter av IdeZ2 proteinet i olika stammar av *S. zooepidemicus*. För att studera dessa proteiners aktivitet har gener kodande för de olika varianterna klonats och uttryckts i *E. coli* (4).

Specifika enzymer vilka klyver bort kolhydratkedjor hos IgG

Bioinformatikstudier av genomet hos båda underarterna identifierade ett protein hos respektive underart vilket uppvisade sekvenshomologier med ett tidigare rapporterat extracellulärt enzym från *Streptococcus pyogenes* kallat EndoS. EndoS hade tidigare visats vara ett endoglykosidas vilket klyver bort kolhydrater från IgG. För att studera de EndoS liknande proteiner i *S. equi* (kallat EndoSe) och *S. zooepidemicus* (kallat EndoSz) klonades och uttrycktes respektive protein i *E. coli*. Sammanfattningsvis visade studier (där vi främst fokuserade på EndoSe, samt fragment av EndoSe) att de var enzymatiskt aktiva det vill säga klyver bort kolhydrater från IgG vilket dramatiskt sänker aktiviteten hos antikroppar vilket mättes i en opsoniseringsmodell. Vidare analyserades EndoSe respektive fragment av EndoSe som antigener i den experimentella infektionsmodellen på möss. Resultaten från dessa försök visade att immunisering med EndoSe gav en skyddseffekt mot senare infektion av *S. equi* och *S. zooepidemicus* (1).

Fibronektin och kollagen-bindande proteiner

Under infektionsprocessen är en patogen bakteries förmåga att specifikt binda till komponenter hos värden en viktig egenskap. Vi har tidigare rapporterat att *S. equi* och *S. zooepidemicus* har flera extracellulära proteiner, även kallade adhesiner, vilka specifikt binder till olika proteiner i extracellulära matrix hos värden. I projektet ingick att fortsätta dessa studier av en grupp proteiner vilka specifikt binder fibronektin och/eller kollagen. I det fortsatta projektet har vi fokuserat på *S. equi* proteinerna tillhörande FNE-familjen (FNE-FNEF) där vi bl.a. använt ELISA och biosensorteknologi för att studera interaktionen mellan de bakteriella proteinerna och värdcellsproteinerna. En del av detta arbete innefattar att försöka kartlägga vilka delar av bakterieproteinerna som binder fibronektin resp. kollagen. Detta gjordes genom att specifikt med hjälp av så kallad "deletion mapping" ta bort vissa delar av några utvalda FNE-proteiner. För att studera till vilken del av fibronektin resp. FNE-protein binder har proteolytiska fragment av fibronektin använts. Även dessa studier har utförts med en kombination av ELISA och biosensoranalyser. Vidare har dessa bindningsanalyser kombinerats med olika inhibitionsförsök för att undersöka om de olika FNE-proteinerna binder till samma site på fibronektin resp. kollagen

Interaktionsstudier med eukaryota celler

För att studera den biologiska funktionen hos bakterieproteiner vilka interagerar med fibronectin och kollagen har vi ett samarbete med Prof. K. Rubins forskargrupp. Forskargruppen vid Uppsala universitet har en mycket lång erfarenhet och experimentella system för att studera extracellulär matrix hos eukaryoter. För att studera om de extracellulära bakterieproteinerna påverkar eukaryota cellers förmåga att interagera med extracellulära matrixproteiner används en kollagen-kontraktionsmodell. Försöksmodellen kan förenklat beskrivas enligt följande: eukaryota celler (mus C2C12 myoblast celler) blandas i en kollagensuspension vilken efter inkubation bildar en gel. I normalfallet kommer cellerna under inkubationstiden att binda till kollagen och kontrahera gelen vilket kan följas och mätas mikroskopiskt. Graden av kontraktion kan redovisas som minskning av gelarean i jämförelsen med arean vid försökets start. För att studera bakterieproteinernas effekt på kontraktionen har vi tidigare screenat en serie av olika rekombinanta proteiner. Resultaten visade att vissa proteiner inte påverkade C2C12 cellernas förmåga att kontrahera kollagengelen medan FNE stimulerade kontraktionen. Vidare kunde ett av de testade proteinerna, kallat CNE, inhibera kontraktionen. I det fortsatta arbetet planerar vi dels studera några av de ännu inte testade fibronectin och/eller kollagen-bindande FNE-proteiner samt några av de fragmenterade proteinerna som erhållits via deletionsmappning (3).

I samarbete med Prof. Pejler har studerats hur *S. equi* påverkar eukaryota mastceller. Resultaten visade att genom att samodla bakterierna med mastceller inducerades respektive nedreglerades vissa metalloproteaser tillhörande en familj av proteiner hos mastcellerna kallade ADAMTS (2).

Diskussion

I projektet har vi studerat ett flertal extracellulära proteiner hos både *S. equi* och *S. zooepidemicus* vilka anses vara potentiella virulensfaktorer. Den första gruppen vi studerat är två olika enzymer som på olika sätt inaktiverar IgG antikroppar. Immunoglobulin G är av central betydelse i skyddet av värden mot patogena bakterier. Den första gruppen enzymer är endopeptidaser vilka inaktiverar IgG genom att specifikt klyva sönder IgG. Genom att klonas och producera rekombinanta proteiner studerades den IgG-klyvande aktiviteten hos båda subarterna. Studierna visade att *S. equi* kodar för två stycken IgG-endopeptidaser kallade IdeE resp. IdeE2 vilka uppvisar olika endopeptidasaktivitet mot utvalda IgG från olika djurslag vidare uppvisar IdeZ resp. IdeZ2 från *S. zooepidemicus* likande egenskaper. Jämförelser mellan proteinsekvenserna visar att proteinerna är närbesläktade. Vidare analyser av dessa proteiner från ett större antal stammar visade att både IdeE och IdeZ är väl konserverade medan IdeZ2 varierar mellan olika *S. zooepidemicus* isolat. För att studera dessa variationer har ett antal gener från den senare varianten klonats och de rekombinanta proteinerna studerats med avseende på IgG-klyvande aktivitet. Resultaten från dessa studier håller på att sammanställas till ett manuskript (4).

Den andra gruppen enzymer som studerats modifierar IgG genom att klyva bort kolhydratkedjor på IgG vilket medför att aktiviteten hos IgG minskar. Dessa enzymer kallas endoglykosidaser och studierna visade att både *S. equi* och *S. zooepidemicus* har ett enzym kallat EndoSe resp. EndoSz. Opsoneringsstudier av främst EndoSe visade att enzymet sänker aktiviteten hos antikroppar. Vidare studerades huruvida rekombinant EndoSe kan användas som antigen i en vaccinformulering för att framkalla skydd vid en senare infektion av *S. equi*. I korthet kan vi konstatera att både *S. equi* och *S. zooepidemicus* har den genetiska förmågan att producera ett flertal extracellulära enzymer vilka attackerar och inaktiverar IgG. Dessutom kan bakterierna producera cellyteproteiner vilka specifikt binder till IgG t.ex. EAG

och ZAG (vilka vi studerat i tidigare projekt). Sammantaget framstår det som om bakteriernas förmåga att interagera med IgG är en viktig egenskap som selekterats fram under evolutionen.

Vidare har vi studerat de fibronektin och kollagen-bindande proteinerna vilka ingår i en närbesläktad grupp ahesiner kallade FNE-proteiner. Vi har benämnt att de tillhör en familj främst utifrån deras homologi och aktivitet att interagera med fibronektin och/eller kollagen. I studierna av dessa proteiner har vi kartlagt de bindande regionerna i bakterieproteinerna samt studerat till vilka bindningssite proteinerna binder på fibronektin resp. kollagen. Sammantaget framstår det som om bakteriernas förmåga att producera ett stort antal extracellulära proteiner vilka alla binder till fibronektin och/eller kollagen är en viktig egenskap som selekterats fram under evolutionen. I samarbete med Prof. Rubins forskargrupp har vi tidigare studerat hur ett av proteinerna, FNE, påverkar värdcellers förmåga att interagera med extracellulära matrixkomponenter. Resultaten var mycket intressanta då det pekade på en ny mekanism i infektionsprocessen. Fördjupade studierna av hur de andra FNE-proteinerna påverkar värdcellers förmåga att interagera med extracellulära värdproteiner såsom kollagen är därför högt prioriterat. I samarbete med Prof. Wallers forskargrupp har en mutant vilken saknar ett av dessa proteiner, kallat FNE, tagits fram. I samarbete med Prof. Rubins forskargrupp har denna mutant studerats i en *in vivo* infektionsmodell på mus. Resultaten från dessa studier har hittills varit svårtolkade varför ytterligare studier krävs för att man ska kunna dra några slutsatser.

I samarbete med Prof. Pejlers forskargrupp har vi studerat hur *S. equi* påverkar mastceller. Dessa celler har en stor betydelse som effektorceller i immunsystemet och deltar i både det nedärvda och förvärvade immunsvaret. Deras bidrag i det immunologiska svaret är kanske mest känt för histaminfrisättning men det har också visats att de kan delta i det nedärvda immunologiska försvaret mot bakterier, virus och parasiter. Förutom histamin kan de efter stimulering frisätta en rad olika immunologiska mediatorer. Genom att samodla *S. equi* med mastceller inducerades respektive nedreglerades vissa metalloproteaser tillhörande en familj av proteiner hos mastcellerna kallade ADAMTS (2). Detta är mycket intressant då proteaser i denna familj kan degradera ett flertal komponenter i extracellulära matrix hos värden vilket är en viktig del i den naturliga remoduleringsprocessen av extracellulära matrix.

Publikationer

1. Flock, M., Frykberg, L., Sköld, M., Guss, B. and Flock, J.-I. (2012) Antiphagocytic function of an IgG glycosyl hydrolase from *Streptococcus equi* subsp. *equi* and its use as a vaccine component. *Infect Immun* 80:2914-2919.
2. García-Faroldi, G., Rönnberg, E., Orro, A., Calounova, G., Guss, B., Lundequist, A. and Pejler, G. (2013) ADAMTS: novel proteases expressed by activated mast cells. *Biol Chem*. 394:291-305.

Planerade manuskript

3. I en tidigare doktorsavhandling av Jonas Lannergård SLU ISBN 91-576-7129-X ingick ett manuskript med titeln "FNE belongs to a novel family of fibronectin-binding and collagen-binding proteins of *Streptococcus equi* subspecies *equi*". Planeringen är att en del av de nya resultaten rörande de fibronektin och kollagen-bindande proteinerna ska bygga på detta manuskript innan det skickas in för publikation.
4. Resultaten från de fördjupande studierna rörande de IgG-klyvande enzymerna håller på att sammanställas till ett manuskript för publikation.

Slutsatser

Stiftelsens stöd av projektet har möjliggjort att forskarstuderande Greta Hulting har kunnat fortsätta sina studier rörande de potentiella virulensfaktorerna hos *S. equi* och *S. zooepidemicus*. Finansieringen har även bidragit till att vår forskargrupp har kunnat upprätthålla våra grundvetenskapliga samarbeten med forskargrupperna ledda av Prof. Jan-Ingmar Flock, Karolinska Institutet, Prof. Kristofer Rubin Uppsala Universitet, Prof. Gunnar Pejler, SLU samt Dr. Andrew Waller, Animal Health Trust (AHT), New Market, England.

Resultatförmedling

Deltagande i internationella möten

Under projekttiden medverkade forskarstuderande Greta Hulting 2011 vid två internationella konferenser där hon via posters presenterade forskningsresultat rörande IgG endopeptidaserna. Den först konferensen var det årliga ASM mötet (General Meeting of the American Society for Microbiology) i New Orleans 18-24 maj. Ett möte som lockar 10 000 tals deltagare inom området mikrobiologi. Den andra konferensen var ett möte i Palermo 4-9 september som specifikt riktar sig till forskare inom streptokock-forskning, den så kallade Lancefield-konferensen.

Forskningsinformation till studenter på grund och avancerad nivå samt till forskare

Huvudansvarig för projektet (B. Guss) deltar årligen i undervisningen vid ett flertal kurser för studenter på olika nivåer vid SLU. Under dessa kurser brukar vanligtvis relevanta delar av våra forskningsresultat presenteras. Vidare presenteras forskningsresultaten vid seminarier eller träffar där olika forskare träffas.

Relevans för näringen

Vår forskargrupp har under många år i samarbete med andra forskargrupper bedrivit grundläggande studier av *S. equi* och *S. zooepidemicus*. Ett av våra långsiktiga mål när det gäller den tillämpade forskningen är att våra resultat ska bidra till utvecklingen av nya vacciner som skyddar hästar mot infektioner. Att få tillgång till ett säkert och effektivt vaccin mot främst kvarka är mycket angeläget för alla som verkar inom hästsektorn. I samarbete med Prof. Flocks forskargrupp och företaget Intervacc AB har vi under många år bedrivit ett projekt för att utveckla ett säkert och effektivt vaccin mot kvarka. I detta vaccinationsprojekt är även Dr. Wallers forskargrupp vid AHT involverade samt ett flertal nationella och internationella företag. Ytterligare information om vaccinutvecklingen rörande kvarka och företaget Intervacc kan fås via länken <http://intervacc.com/index.php?lang=sv>

Observera att inga medel från Stiftelsen har använts i samarbetet med Intervacc och att detta samarbete inte försvårat eller fördröjt publiceringen av våra forskningsresultat.